

雌性発生法によるビブリオ病抗病性アユの作出

稲田 善和
(内水面研究所)

Breeding of Group Resistant to Vibriosis by
Gynogenesis in Ayu *Plecoglossus altivelis*

Yoshikazu INADA
(Freshwater Laboratory)

雌性発生法を利用した育種法は、約20代もの世代交配を要する従来の選択育種法に較べて、ある特定の優れた量的（遺伝的）形質を、2世代目で固定できると考えられている。¹⁾しかし、これまでにこの理論を実証した事例は未だ見当たらない。

水産生物の増養殖において、抗病性は、その生物の生産を左右する極めて重要な形質のひとつである。

そこで筆者は、大量生産が可能となった第二極体放出阻止型雌性発生2倍体アユ²⁾を用いて、アユの代表的な細菌性疾病であるビブリオ病について、正常2倍体アユを対照に、ワクチン処理後の血中抗体価の個体変異を比較検討した。さらに、両者について人為感染による選抜を行い、次代の雌性発生群の抗病性について検定を行った。その結果、本法によって、ビブリオ病に対して抗病性をもつアユ群の作出が、現実的に可能であるといういくつかの知見を得たので報告する。

方 法

1. *Vibrio anguillarum* に対する血中抗体価の個体変異

供試魚：1989年10月に、筑後川産天然アユ親魚の雌雄12尾ずつを用いて、紫外線照射と低水温シヨツ

ク法²⁾によって、G2N-A（第二極体放出阻止型雌性発生2倍体）と、Control（通常交配による正常2倍体）を作出した。この両者を種苗生産し、'90年7月まで養成した未成魚を供試魚とした。

両者は6月から実験に供するまでの35日間、同一水槽内で混養しておいた。

ワクチン処理：共立商事KKより分与を受けた血清型Aの*V. anguillarum*PT-479の強毒株を供試菌株とした。ワクチン処理は、約15gサイズのG2N-AとControlの供試魚各111尾の腹腔内に、0.05 mlずつのFKC（ホルマリン死菌）を注入することによった。³⁾ワクチン処理後は、両者を5t水槽に収容し、流水飼育を行った。また、ワクチン処理をしなかった群も処理群と同様の飼育を行った。飼育期間中の水温は20.5～21.5℃であった。

血中抗体価の測定：ワクチン処理後30日目に、同サイズのG2N-AとControlをそれぞれ40尾ずつ取りあげ採血を行った。採取した血液は4℃で1夜放置した後、血清を分離採取した。血清は測定に供するまで、-80℃で凍結保存しておいた。また、ワクチン処理をしなかった群からも、G2N-AおよびControlをそれぞれ10尾ずつ取

りあげ血清を採取した。採血時の各供試魚の尾叉長と体重は、G2N-Aが 13.5 ± 0.8 cm, 25.2 ± 4.6 gで、Control は、 14.4 ± 0.7 cm, 28.4 ± 3.6 gであり、G2N-Aの方がControl よりもわずかに小さかった。血中抗体価は、凍結しておいた血清

のうち、約 10 gサイズのものをそれぞれ 600 尾ずつ選び出し、供試魚とした。

供試菌株には、*V. anguillarum* PT-479 株の強毒株を用いた。選抜実験に先立って、一旦、供試魚以外のアユに、同株を筋肉注射して人為感染さ

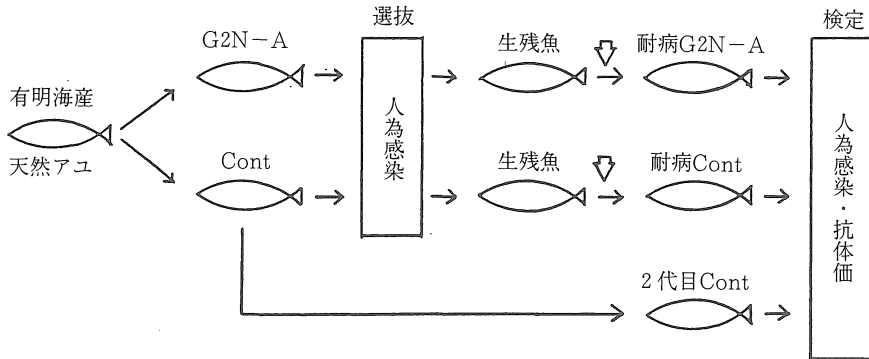


図1 ビブリオ病抗病性アユの選抜、検定の経過（第二極体放出阻止）

を解冻し、直ちにマイクロタイター法によって測定した。

2. 選抜、検定の経過

供試魚の作出から、人為感染による選抜を経て人為感染と血中抗体価による抗病性の検定に至るまでの一連の経過を図1に示した。

まず、筑後川産天然アユ親魚から、G2N-AとControlの2者を作成した。この両者を未成魚まで養成し、*V. anguillarum*を用いて人為感染による選抜を行った。以後、それぞれの生残魚を親魚にまで養成し、G2N-A 29尾から耐病G2N-A（第二極体放出を抑えた2代目の雌性発生魚）を作成した。同様に、Controlの雌27尾を用いて、耐病Control（2代目の雌性発生魚）を作成した。また、対照として人為感染による選抜を行わなかったControlの雌26尾と雄17尾を用いて、2代目のControlを作成した。これら耐病G2N-A、耐病Control、2代目Controlの3系統を未成魚まで養成し、人為感染と血中抗体価による抗病性の検定に供した。

3. 選抜法

供試魚、供試菌株：'89年10月に作出し、翌'90年7月まで養成したG2N-AとControlの未成魚

せ、その感染魚を -80°C で凍結保存して病原性を保持しておいた。⁵⁾

人為感染：凍結しておいた感染魚を解冻し、供試菌を再分離した。次いで、菌濃度が 10^2 CFU/mlになるような菌浮遊液を調整した。この菌浮遊液に、供試魚を5分間浸漬することによって人為感染させた。⁴⁻⁵⁾その後、供試魚を400l水槽に收容し、環流による流水飼育を無給餌で行った。しかし、10日間を経過しても、へい死魚が供試魚数の10%にも満たなかったため、14日目に菌濃度を 10^4 CFU/mlレベルまで高くして、2回目的人為感染を行った。その後、再び流水飼育を行い、14日後に生残魚を5t水槽内に收容し、給餌をしながら流水飼育を行った。また、供試魚のへい死が、人為感染によるものであるかどうかの確認は、主としてへい死魚の症状によった。しかし、症状が明らかでないへい死魚については、腎臓部からの細菌分離を行い、抗血清によるスライド凝集反応で判定した。

4. 抗病性の検定法

供試魚：'90年10月に、G2N-AとControlの選抜生残魚を親魚として、2代目の耐病G2N-Aおよび耐病Controlを作成した。対照として、選

抜しなかった Control から 2 代目の Control を作出した。この 3 者を翌 '91 年 7 月まで養成して供試魚とした。また、量的（遺伝的）形質の対照として、養成したクローン（和歌山系継代クローン 3 代目）を用いた。

人為感染による検定：耐病 G2N-A, 耐病 Control, 2 代目 Control およびクローンの 4 系統について、選抜法と同じく浸漬感染法で人為感染させ、以後の生残状況を比較した。実験は条件を変えて 3 回にわたって行った。すなわち、実験 I の菌濃度は 1.0×10^3 CFU/ml で、実験 II では 7.6×10^4 CFU/ml, 実験 III のそれは 1.5×10^4 CFU/ml であった。また、実験 I, II では、40 l 水槽を用いて、人為感染後の各系統のアユを 30 尾ずつおよび 25 尾ずつ個別に収容し、10 日間の無給餌流水飼育とした。実験 III は、人為感染後の各系統のアユ 30 尾ずつを 400 l 水槽に混合して収容し、12 日間の無給餌流水飼育とした。各実験において、供試菌によるへい死であることの確認は、へい死魚の症状の観察と、腎臓部からの細菌分離を行い、抗血清によるスライド凝集反応をみることによった。実験期間は、7 月 19 日～8 月 31 日で、期間中の水温は 20.6～20.9℃であった。実験 I～III に用いた各系統の供試魚の尾叉長は、耐病 G2N-A が 10.4～10.8 cm, 耐病 Control が 10.5～11.0 cm, Control が 10.1～10.3 cm, クローンは 9.9～10.6 cm であった。

血中抗体価による検定：FKC によってワクチン処理した各系統の供試魚は、5 t 水槽を用いて、耐病 G2N-A と耐病 Control, 2 代目 Control とクローンの組合せで混合して収容した。飼育水温は 20.3～21.4℃で、給餌をしながら流水飼育を行った。ワクチン処理後 40 日目に、各供試魚の 30 尾ずつを取りあげ採血を行った。採血後は血清を分離凍結し、後日のマイクロタイター法による血中抗体価の測定に供した。採血時の各系統の供試魚の尾叉長と体重は、耐病 G2N-A が 13.5 ± 0.5 cm, 26.1 ± 3.2 g, 耐病 Control が 14.6 ± 0.5 cm, 30.0 ± 4.5 g, 2 代目 Control が 13.5 ± 0.9 cm, 25.0 ± 4.9 g, クローンは 12.1 ± 0.8 cm, $15.4 \pm$

3.4 g であった。このように、耐病 Control がやや大きく、耐病 G2N-A と 2 代目 Control はほとんど同じ大きさで、クローンは他の 3 者より小さかった。

結 果

1. 血中抗体価の個体変異

ワクチン処理しなかった G2N-A と Control のそれぞれ 10 尾の抗体価は、いずれの個体も 4 以下 (<4) であった。しかし、ワクチン処理を行った G2N-A と Control では抗体価の上昇がみられた。抗体価各値におけるそれぞれの尾数で表した両者の個体変異を図 2 に示した。図にみられるように、G2N-A の個体変異は <4～64 と、Control の <4～32 よりも広い結果となった。すなわち、G2N-A においては、Control に較べて、免疫能が高い個体が存在し、かつ低い個体も存在することを示した。

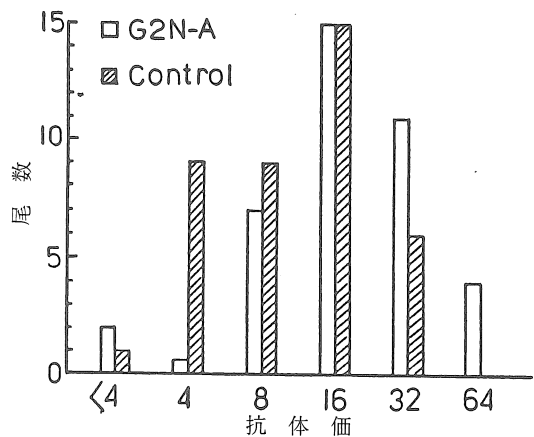


図 2 G2N-A と Control の血中抗体価における個体変異

2. 選抜

人為感染による選抜は、1 回目は、へい死が供試魚数の 10% 未満であったので、2 回にわたって実施した。初回の浸漬感染の菌濃度が 7.0×10^2 CFU/ml であったことから、2 回目は 2.0×10^4 CFU/ml に濃度を上げて行った。その結果、へい死が出現せず安定した時点（2 回目の人為感

染後 11 日目) での G2N-A と Control の両区の生残率は、いずれも 50 % 以下となった。その後、5 t 水槽へ移して混合飼育を行ったが、32 日の飼育時点でのそれぞれの生残尾数と生残率は、G2N-A が 270 尾、45 % で、Control は 242 尾、40 % であった。なお、2 回の選抜実験中のへい死魚は、そのほとんどが供試菌によるへい死であった。また、水槽内での二次感染によるへい死傾向もみ

た。実験 II においては実験 I よりも人為感染の菌濃度が高かったため、耐病 G2N-A も 4 日目からへい死したが、その割合は他の 2 者よりも低く、10 日目では 40 % が生残した。一方、耐病 Control は、2 日目からへい死がみられ、へい死魚も最も多く、8 % の生残率であった。2 代目 Control は、3 日目からへい死がみられたが、そのへい死は前 2 者の中位で、16 % が生残した。実験

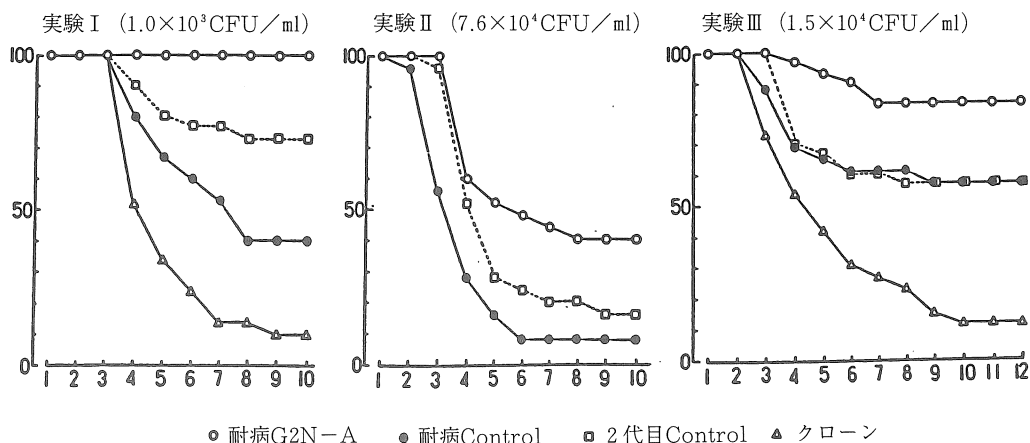


図 3 人為感染による検定実験 I ~ III における各系統の生残率の経日変化

られなかった。ただ、2 回目の浸漬処理時や 5 t 水槽への移槽直後およびその後の飼育において、供試菌以外の要因によるへい死魚が、双方に数尾みられた。

3. 抗毒性の検定

人為感染による検定：実験 I ~ III における、耐病 G2N-A、耐病 Control、2 代目 Control およびクローンの人為感染後の生残率の経日変化を図 3 に示した。図に示したように、実験 I においては、耐病 G2N-A ではへい死が全くみられなかったのに対して、耐病 Control は 4 日目からへい死魚が出現し、10 日目では 40 % が生残した。一方、2 代目 Control は、同じく 4 日目からへい死がみられ、10 日目では 73 % が生残し、前 2 者の中間の生残率を示した。また、クローンは、同じく 4 日目からへい死がみられたが、その後のへい死傾向は急激で、10 日目には 10 % しか生残しなかつ

た。実験 II においては実験 I よりも人為感染の菌濃度が高かったため、耐病 G2N-A も 4 日目からへい死したが、その割合は他の 2 者よりも低く、10 日目では 40 % が生残した。一方、耐病 Control は、2 日目からへい死がみられ、へい死魚も最も多く、8 % の生残率であった。2 代目 Control は、3 日目からへい死がみられたが、そのへい死は前 2 者の中位で、16 % が生残した。実験 III においては、耐病 G2N-A でも、4 日目からへい死がみられたが、生残率は高く、12 日目では 83 % が生残した。他方、耐病 Control は、2 代目 Control と同傾向のへい死状況で、最終日には両者とも 57 % が生残した。クローンは、へい死魚が最も多く、13 % が生残したにすぎなかった。

血中抗体価による検定：耐病 G2N-A、耐病 Control、2 代目 Control およびクローン 4 者の抗体価の個体変異を図 4 に示した。図にみられるように、各系統とも抗体価が 4 以下の個体が多く、変異幅が余り明らかではなかった。しかし、耐病 G2N-A は、耐病 Control や 2 代目 Control よりも、抗体価が高い個体が多く、個体変異がいく分高い方へ偏っている傾向がみられた。耐病 Control は、変異幅自体は耐病 G2N-A と同じであるが、抗体価が高い個体は少なかった。また、2 代目 Control は、耐病 G2N-A や耐病 C

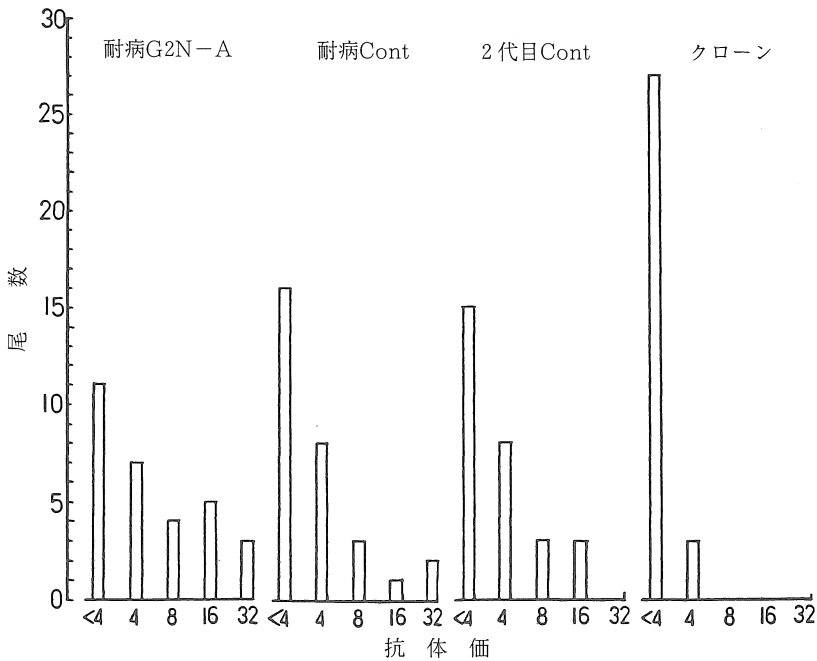


図4 血中抗体価による検定における各系統の抗体価の個体変異

ontrol に較べて狭い変異幅を示した。一方、クローンは、図にみられるように他の3者にはみられない、極めて特徴的な狭い個体変異を示した。

考 察

筑後川産天然アユ親魚から作出した、第二極体放出阻止型雌性発生2倍体であるG2N-Aと、Controlについて、血清型Aの*V. anguillarum*PT-479株を供試菌として、ワクチン処理30日後の血中抗体価の個体変異を比較検討した。その結果、Controlに較べて、G2N-Aは幅広い抗体価の変異を示した。このことは、雄の遺伝子が介在せず、雌の遺伝的形質のみが伝わる第二極体放出阻止型雌性発生2倍体においては、遺伝的形質の変異が、通常交配の正常2倍体よりも拡大するという現象¹⁾とよく合致している。本来、表面に現れる形質は、遺伝的要因と環境的要因によるものとされている。¹⁾ 本実験に用いた供試魚は、同一の天然親魚群から採取した卵や精子を用いて作出したものであり、種苗生産期や一部稚魚期を除き混養によって飼育したものである。すなわち、環境的要

因による個体差が極力除かれるよう配慮して飼育を行った。したがって、本実験における、G2N-Aの抗体価の変異の拡大は、遺伝的要因による可能性が高いと言えよう。換言すれば、G2N-Aの群の中には、血清型Aの*V. anguillarum* に対して、遺伝的に高い免疫能、すなわち抗病性をもつものが存在すると推定される。

この抗病性をもつものが存在し、かつその形質が遺伝的であるならば、耐病系の選抜によって強い群が残る可能性がある。その群から雌性発生魚を作出すれば、抗病性の選択反応が期待される。そして、検定によって抗病性があるとされれば、それは、雌性発生2代目において、抗病性アユ群が作出できたことを意味する。

前述したように、本研究では、耐病選抜は人為感染によって試みた。供試菌による2回の選抜の結果、へい死魚の全てが供試菌によるへい死ではなかったが、G2N-Aが45%、Controlでは40%が生残した。この生残率が示すように、強度の選抜とは思えなかったが、それぞれの生残魚から、雌性発生2代目の耐病G2N-Aと耐病Control

を作出した。対照として無選抜の2代目 Control も作出した。また、継代3代目のクローンも遺伝的形質の対照として生産した。これら4者について、人為感染による検定と、ワクチン処理後の抗体価による検定を行った。人為感染による3回の検定実験の結果、耐病G2N-Aは、いずれの実験においても、他者より高い生残率を示した。このことは、初代の雌性発生群 (G2N-A) についての、人為感染による選抜が実効的であったことを示唆している。この3回の検定実験において、耐病 Control は、2代目 Control よりも、実験 I, II では低い生残率を示し、実験 III では同等の生残率を示した。これらの結果は、耐病 Control が、正常2倍体の段階で選抜された群を親とする、すなわち、実質的には初代の雌性発生魚に当たるため、その特性である個体変異の拡大が表れたためではないかと推定される。別の観点からみれば、2代目 Control よりも生残率が相対的に低いということは、正常2倍体を耐病選抜しても、その次代における選抜効果は余り期待できないことを示唆している。一方、もうひとつの対照として用いたクローンは、2回の実験において急激なへい死状況を示し、その生残率も他の3者より低かった。このことは、クローンの全ての個体が均質な遺伝形質を有していることを示すとともに、⁶⁾ G2N-Aや Control に抗病性の遺伝変異が含まれていることを示している。

他方、血中抗体価による検定では、各系統とも抗体価が余り高くなかった。しかし、耐病G2N-Aは、耐病 Control や2代目 Control に較べて、抗体価の変異が高い方へ偏る傾向がみられた。抗体価が+となった4～32の個体数と、抗体価が中位以上の8～32の個体数を各系統別にみると、表1のようになる。いずれの範囲においても、G2N-Aの個体数が最も多く、免疫能が高くなったことを示している。一方、耐病 Control は、2代目 Control に較べると、抗体価4～32では1尾少なく、8～32では同数であった。全体としてみると、免疫能が高い個体を含んでいるものの、2代目 Control と同等か、もしくは低

い免疫能をもった群であることがうかがわれる。また、クローンは、抗体価4～32では3尾のみで、図4にもみられたように、極めて狭い個体変異を示し、<4～4の個体で占められていた。これは、このクローンが他の3者に較べて、免疫能が低くかつ均質という形質をもつことを示している。

これらの抗体価による検定結果は、前述の人為感染による検定の結果とよく符合しており、耐病G2N-Aが抗病性形質を有していると評価されよう。このことは、人為感染による雌性発生魚の選抜が有効であり、その選抜対象魚 (G2N-A) が、血清型Aの *V. anguillarum* に対して、遺伝的な抗病性形質を有していたことの証明になり得る。すなわち、血中抗体価によって、本菌に対する抗病性の遺伝的形質が識別評価できることを示している。換言すれば、野生アユから第二極体放出阻止型雌性発生アユを作出し、血清型Aの *V. anguillarum* の人為感染によって選抜を行い、その生残群から2世代目の雌性発生アユを作出すれば、同菌によるピブリオ病に対して抗病性をもったアユ群を作出することができると言えよう。

また、検定実験に用いたクローンは、第一卵割阻止型雌性発生アユの1個体から、第二極体放出阻止によって作出され継代されたアユである。したがって、全ての個体が同型接合体をもち、同一の遺伝子型をもっている。¹⁻⁶⁾ このクローンは、

表1 各抗体価範囲内の系統別個体数

系 統	抗 体 価	
	4～32	8～32
耐病G2N-A ¹⁾	19	12
耐病Control ²⁾	15	6
2代目Control ³⁾	16	6
クローン ⁴⁾	3	0

- 1) G2N-A耐病選抜 (極体放出阻止2代目)
- 2) Control耐病選抜 (1の対照2代目)
- 3) 耐病選抜を行わなかったControl2代目
- 4) 和歌山系継代クローン3代目

人為感染や血中抗体価による検定実験において、供試菌に対して均質な抗病性を示したことは、その遺伝的形質によるものであると評価される。このことは、第二極体放出阻止型雌性発生アユの供試菌に対する抗病性の個体変異が、遺伝的形質によるものであることを裏付けていると考えられる。

ただ、第二極体放出阻止型雌性発生アユは、異祖接合体をもち、また、卵母細胞の成熟分裂時において、相同染色体間で交叉が生じるため異型接合体になることが知られている。¹⁾ したがって、抗病性アユを作出したとしても、全ての個体が同じ抗病性をもつとは限らず、固定品種にはなり得ない。しかし、抗病性がより優れた群にはなることができ、今後の実用化も期待されよう。

本研究では、*V. anguillarum* の血清型 A 菌を用いて、抗病性アユの作出を検討したものであるが、他の血清型 (B~D) に対して、同様の選抜効果があるかどうかは不明であり、今後の課題である。

要 約

- 1) ピブリオ病に対して、抗病性のあるアユの作出を目的として実験を行った。
- 2) 天然産アユを親魚とした雌性発生 (第二極体放出阻止による作出) アユでは、同一親魚由来の正常アユに比べて、血清型 A の *V. anguillarum* に対する血中抗体価の個体変異に拡大がみられた。
- 3) 上記の供試魚と同一群のアユについて、供試菌を用いた人為感染による選抜を行い、それぞれの生残魚から雌性発生 2 代目アユを作出した。これらのアユと無選抜 2 代目の正常アユおよびクローンアユについて人為感染と抗体価による抗病性の検定を行った。その結果、選抜した雌性発生 2 代目アユは、他のアユに比べて人為感染後の生残率も高く、抗体価も高い方への偏りがみられた。
- 4) 以上の結果から、雌性発生初代アユは、量的 (遺伝的) 形質として抗病性の高い個体を含み、

この群を人為感染によって選抜すれば、血清型 A のピブリオ病に対して、抗病性のあるアユ群を得ることができると考えられた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、学術的指導や助言をいただいた、高知大学 楠田理一教授、谷口順彦教授、河合研児助教授、供試菌の幹施、分与をしていただいた徳島水試 城泰彦博士、共立商事 小松功氏、およびクローンアユの卵を分与いただいた、和歌山県内水面漁業センター 辻村明夫主査研究員に深謝する。なお、この研究の一部は、水産生物有用形質識別評価手法開発事業の委託研究費により実施した。

文 献

- 1) 谷口順彦：染色体操作の遺伝学的意義「水産増養殖と染色体操作」(鈴木亮), 恒星社厚生閣, 東京都, 1989, pp 104 - 117.
- 2) N.TANIGUCHI et al : Conditions to Induce Triploid and Gynogenetic Diploid in Ayu *Plecoglossus altivelis*, Bull. Japan. Soc. Sic. Fish, 52 (1), p p 49 - 53 (1986)
- 3) T.AOKI et al : Protective Immunity in Ayu, *Plecoglossus altivelis*, Vaccinated by Immersion with *Vibrio anguillarum*, *Fish Pathogy*, 19 (3), pp 181 - 185 (1984).
- 4) 城泰彦：アユの *Vibrio anguillarum* 感染症とその予防免疫, 四国医学雑誌, 37 (1), pp 82 ~ 110 (1981).
- 5) 稲田善和ら：人為 3 倍体アユのピブリオ病に対する抗病性, 日水誌, 56 (10), pp 1587 - 1591 (1990).
- 6) HAN et al : Application of DNA Fingerprinting to Confirmation of Clone in Ayu, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58 (11), pp 2027 - 2031 (1992)